

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN  
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)(19) Organización Mundial de la Propiedad  
Intelectual  
Oficina internacional(43) Fecha de publicación internacional  
6 de Mayo de 2004 (06.05.2004)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional  
WO 2004/038010 A1(51) Clasificación Internacional de Patentes<sup>7</sup>: C12N 5/00,  
C12P 21/08[CU/CU]; Calle 1ra, Edif. B4, Apto. 9, entre 178 y 180,  
Rpto. Flores, Playa., 12100 Ciudad Habana (CU). ROJAS  
DEL CALVO, Luis [CU/CU]; Calle 208 No. 1940, entre  
19 y 21A, Atabey, Playa., 12100 Ciudad Habana (CU).(21) Número de la solicitud internacional:  
PCT/CU2003/000012(22) Fecha de presentación internacional:  
22 de Octubre de 2003 (22.10.2003)(74) Mandatario: MORENO SAMPER, Olga, Lidia; Ave.  
1ra No. 1001, Esq. 10, Miramar, Playa., 11300 Ciudad  
Habana (CU).

(25) Idioma de presentación: español

(81) Estados designados (*nacional*): AL, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,  
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,  
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,  
MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT,  
RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR,  
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:  
239/2002 23 de Octubre de 2002 (23.10.2002) CU(71) Solicitante (*para todos los Estados designados salvo  
US*): CENTRO DE INMUNOLOGIA MOLECULAR  
[CU/CU]; Calle 216 Esq. 15, Atabey, Playa., 12100  
Ciudad de la Habana (CU).(84) Estados designados (*regional*): patente ARIPO (GH, GM,  
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente  
euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
patente europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,  
ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE,  
SI, SK, TR), patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,  
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (*para US solamente*): PEREZ  
RODRIGUEZ, Rolando [CU/CU]; Calle Juan Delgado  
No.567 entre Acosta y O'Farrill 10 de Octubre, Vibora.,  
10500 Ciudad Habana (CU). CASTILLO VITLLOCH,  
Adolfo [CU/CU]; Calle 31 No.32003, entre 320 y 322,  
Rpto. L'raga La Lisa., 13600 Ciudad Habana (CU).  
VITORES SARAZOLA, Svieta [CU/CU]; Calle 9na,  
Edif. 28233 Apto. 13, entre 282 y 284 Santa Fe, Playa.,  
12200 Ciudad Habana (CU). BOGGIANO AYO, Tammy

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección  
"Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al  
principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(54) Title: METHOD OF OBTAINING CELL LINES IN A PROTEIN-FREE MEDIUM AND CELL LINES THUS OBTAINED

(54) Título: MÉTODO PARA LA OBTENCIÓN DE LÍNEAS CELULARES EN MEDIO LIBRE DE PROTEÍNA Y LÍNEAS  
CELULARES OBTENIDAS POR ESTE MÉTODO(57) Abstract: The invention relates to a method of obtaining mammal cells which are adapted to grow in a medium free of serum and proteins. The inventive method includes a process consisting of two adaptation steps comprising a critical protein concentration interval, in which the cells must acquire the ability to survive in a protein-free medium. There is a specific critical protein concentration interval for each cell line. The invention also relates to mammal cell lines which grow in a stable manner in a medium free of serum and proteins over at least 40 generations. The invention further relates to clones which express anti-CD6 T1hT and UG1' hR<sub>3</sub> antireceptor humanised antibodies and the anti-CD<sub>3</sub> T<sub>3</sub>Q chimeric antibody as well as fragments of said antibodies.(57) Resumen: La presente invención se relaciona con un método de obtención de células de mamífero adaptadas a crecer en medio libre de suero y proteínas, el cual incluye un proceso en dos etapas de adaptación donde existe un intervalo crítico de concentración de proteína en el cual las células deben ganar la capacidad de sobrevivir en medio libre de proteínas. El intervalo crítico de la concentración de la proteína es específico para cada línea celular. La presente invención también revela líneas celulares de mamíferos que crecen establemente en condiciones de medio libre de suero y proteínas por al menos 40 generaciones. Adicionalmente, los clones revelados en la presente invención expresan los anticuerpos humanizados anti receptor de EGF hR<sub>3</sub> y anti CD6 T1hT y el anticuerpo quimérico anti CD<sub>3</sub> T<sub>3</sub>Q, además de los fragmentos de dichos anticuerpos.

WO 2004/038010 A1

## MÉTODO PARA LA OBTENCIÓN DE LÍNEAS CELULARES EN MEDIO LIBRE DE PROTEÍNA Y LÍNEAS CELULARES OBTENIDAS POR ESTE MÉTODO.

### Sector Técnico:

- 5 La presente invención se relaciona con la biotecnología, específicamente con un método para obtener líneas celulares estables adaptadas a crecer en medio libre de suero y proteína, mediante un proceso en dos etapas de adaptación.

### Técnica Anterior:

- 10 A partir del desarrollo del cultivo *in vitro* de células de mamíferos, la demanda para la producción a gran escala de estas células ha aumentado debido al potencial diagnóstico y terapéutico de muchos de los productos obtenidos por esta vía. Estos agentes útiles incluyen anticuerpos monoclonales, la hormona humana del crecimiento, linfocinas, eritropoietina, factores de coagulación de la sangre y los
- 15 activadores de plasminógeno del tejido.

El uso de los anticuerpos monoclonales recombinantes (AcMr) para la terapia y el diagnóstico *in vivo* de diversas enfermedades implica en muchos casos el uso de los tratamientos a altas dosis. Este hecho hace necesario la producción de AcMr específico en gran cantidad y con una alta pureza.

- 20 Varios anticuerpos monoclonales recombinantes con uso potencial para la terapia y diagnóstico en cáncer y enfermedades auto inmunes se han expresado en las células de myeloma NSO, en el Centro de Inmunología Molecular. US 5,891,996 describe la obtención de anticuerpos quimérico y humanizado contra el receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico, con valor en el diagnóstico y la terapia de tumores que
- 25 expresen dicho receptor. WO 97/19111 describe anticuerpos monoclonales que reconocen el antígeno CD6 para uso diagnóstico y terapéutico en pacientes con psoriasis. Gavilondo y col en Hybridoma 9 No.5, 1999 reportó el anticuerpo IOR-T3a que reconoce el antígeno CD3.

- Para las condiciones de cultivo en medio libre de proteína, se han desarrollado varias
- 30 técnicas. Así, se han desarrollado los medios libre proteína específicamente definidos, que permiten un crecimiento de la célula bajo estas condiciones. WO 97/05240 describe la expresión de proteínas recombinantes bajo condiciones de medio libre de proteínas.

JP 2696001 describe el uso de un medio libre de proteína para la producción del factor VIII en células CHO agregando un agente tenso activo no iónico o ciclodextrina para aumentar la productividad de las células huésped. Para aumentar la eficacia de estos aditivos, se recomienda la adición de, por ejemplo, butirato y litio.

- 5 WO 96/26266 describe el cultivo de células en un medio con hidrolizado de proteína que contiene glutamina, cuyo contenido de aminoácidos libres es menos del 15% del peso total de la proteína, y cuyos péptidos tienen un peso molecular menor de 44 kD. Como medio de cultivo para las células se utiliza un medio mínimo sintético, como el medio básico al cual se agregan además del hidrolizado de la proteína, suero fetal  
10 bovino, gentamicina y mercapto-etanol. No se ha mencionado el uso de medio conteniendo suero para la producción de los factores de la sangre recombinantes.

U. S. 5.393.668 A, describe crecimiento celular bajo condiciones de medio libre de proteína de células adheridas a superficies sintéticas especiales.

- Para estimular la proliferación celular, células CHO que sobre-expresan la insulina  
15 humana proliferan sobre un substrato artificial al cual se ha unido covalentemente la insulina (Ito et al. 1996 PNAS LOS E.E.U.U.. 93:3598-3601).

- Reiter y col. (1992, Cytotechnology 9:247-253) describen la inmovilización de las células r-CHO primero crecidas a alta densidad sobre portadores en medio que contiene suero, y la subsiguiente perfusión de las células inmovilizadas en el medio  
20 sin proteína durante la fase de producción, encontrándose una liberación continua de la proteína en el sobrenadante del cultivo. Allí, las células fueron mantenidas por menos de 10 generaciones en el medio sin proteína.

- Los métodos anteriores para la preparación acertada de un cultivo de células a gran escala bajo condiciones de medio libre de proteína se han descrito para líneas  
25 celulares mantenidas en cultivo, en particular las células VERO (WO 96/15231). En el cual las células se crecen bajo condiciones de medio libre de suero y proteína desde el ampolla original hasta una gran escala técnica de 1200 litros.

- Adaptar las células crecidas inicialmente bajo condiciones medio conteniendo suero al medio libre de proteína, es un proceso algo molesto que toma generalmente  
30 tiempo, además, se ha encontrado que la producción de proteína expresada y de la productividad de las células CHO recombinantes disminuye grandemente después de la adaptación al medio sin proteína con respecto al que contiene suero (Paterson et al. 1994. Appl. Microbiología. Biotechnol. 40:691-658). Ésta es a consecuencia de la

inestabilidad o la disminución del crecimiento del clon recombinante debido al cambio en las condiciones de cultivo. A pesar del uso de un clon original estable, a causa de las condiciones extremas en la fermentación, una porción grande de las células reduce o pierde totalmente su capacidad de expresión, las cuales crecen  
5 mucho mas que las células productoras durante el proceso de producción, por lo que finalmente el cultivo del fermentador consista en una mayor población de células no-productoras o de células que tienen una expresión baja.

La presente invención proporciona una estrategia para desarrollar líneas celulares estables adaptadas a crecer en medio libre de suero y proteína. Siguiendo la estrategia  
10 propuesta, se han obtenido diferentes clones adaptados a crecer en medio libre de proteína.

#### **Descripción Detallada de la Invención:**

**Adaptación en dos etapas de líneas celulares al crecimiento en medio libre de  
15 proteínas.**

Este procedimiento abarca las líneas de células de mamíferos, para las cuales no es posible realizar un procedimiento directo de adaptación del medio suplementado con suero al medio libre de suero y proteína.

El método de la invención incluye dos etapas en la adaptación de la línea al medio  
20 libre de proteína (MLP). En la primera etapa, considerada no crítica, la reducción del contenido de proteínas del medio ocurre sin la pérdida de la viabilidad celular y no hay una disminución importante del tiempo de doblaje de la población en cada paso durante la reducción de la concentración de proteína. La etapa no crítica se observa generalmente entre 5 y 0,5 mg/mL de proteína total en el medio de cultivo y este casi  
25 muestra el mismo índice de crecimiento que en el medio de cultivo inicial.

Para iniciar esta primera etapa, se parte de una línea con una viabilidad celular entre 80 y 100%, y las células se crecen sucesivamente en medio de cultivo con concentraciones decrecientes de proteína hasta alcanzarse una concentración crítica donde la viabilidad cae a 0%, la que constituye el punto de partida para el inicio de la  
30 segunda etapa.

En esta segunda etapa considerada crítica, en la cual ocurre una disminución de la viabilidad y del tiempo de doblaje celular, las células requieren de más tiempo para adaptarse al pasar de un paso de la concentración de la proteína otro de menor

concentración. Existen concentraciones críticas de proteína en el medio de cultivo, que no es posible pasar por alto durante el proceso de adaptación. Estas concentraciones críticas de proteína son específicas para cada línea celular, y generalmente están por debajo de 0,6 mg/mL. Una vez que las células hayan recuperado los índices iniciales de viabilidad y velocidad crecimiento en estas concentraciones críticas de proteína, es posible cultivar las células en la condición siguiente, con una concentración de proteína más baja.

Para llevar esta segunda etapa, una vez determinada la concentración crítica, se busca la concentración anterior donde aún existe crecimiento celular considerada como concentración pre-crítica, y a partir de la misma se disminuye lentamente dicha concentración de proteína hasta que las células recuperen la viabilidad y el tiempo de doblaje original.

La combinación de pasos para reducir la concentración de proteína en la etapa crítica determinará el tiempo total de adaptación en esta etapa y la velocidad de la adaptación (V<sub>adapt.</sub>), calculado como la relación:

$$V_{\text{adapt.}} = \frac{\Delta \text{Concentración de Proteína}}{\Delta T_{\text{adapt.}}}$$

Sin embargo esta combinación de pasos no tendrá influencia sobre el tiempo necesario para la adaptación a cada concentración de proteína, incluyendo las concentraciones críticas.

Es decir, para determinar el final de la etapa no crítica y de las concentraciones críticas es necesario llevar a cabo una adaptación paso a paso, esto se realiza mediante diluciones seriadas del cultivo celular en el medio sin proteína deseado, reduciendo a la mitad la concentración de proteína en cada paso (Tabla 1). Esta reducción se puede hacer tanto por la disminución de la concentración de suero o suplementando el medio básico con diferentes niveles de algunos sustitutos del suero ricos en proteínas.

**Tabla 1:** Reducción paso a paso de la concentración de proteína para determinar las concentraciones críticas, comenzando con un medio de cultivo suplementado con 5 mg/mL de proteína (equivalente a 10 % de suero fetal bovino).

Paso Número	Concentración de proteína total mg/mL	Concentración Equivalente SFB*, % v/v
1	5.000	10.00
2	2.500	5.00
3	1.250	2.50
4	0.625	1.25
5	0.312	0.60
6	0.156	0.30
7	0.000	0.00

5

Leyenda: SFB- Suero Fetal Bovino

MLP- Medio Libre de Proteína

MCS- Medio Conteniendo Suero

\*El contenido total de proteína del suero fetal bovino se ha estimado alrededor de 50 mg/mL <sup>(6)</sup>.

Antes de comenzar el procedimiento de adaptación las células se deben mantener con más de 80% de viabilidad en frascos-T en el medio estándar empleado generalmente para cultivar las células.

Para realizar la adaptación se llevan a cabo de forma consecutiva los siguientes pasos que transitan por las dos etapas previamente mencionadas:

- i. Las células se siembran en al menos 3 réplicas una densidad de  $1 - 5 \times 10^5$  células/ml en medio de cultivo conteniendo suero y proteínas, después de 48 horas la mitad del sobrenadante del cultivo se reemplaza por medio fresco libre de proteína quedando la concentración final de proteína al 50% de la concentración inicial;
- ii. Se reemplaza todo el medio de cultivo cada 48 horas por el medio fresco con 50% de la concentración inicial de proteínas;

- iii. Se dejan crecer las células en el medio con 50% de la concentración inicial de proteínas hasta que el cultivo alcance la confluencia;
- iv. Se siembran las células obtenidas en el paso anterior (iii) en al menos 3 réplicas a una densidad de  $1 - 5 \times 10^5$  células/ml en el medio que contiene 50% de la concentración inicial de proteína y después de 48 horas de crecimiento, se reemplaza la mitad del sobrenadante del cultivo por medio fresco libre de proteína, quedando la concentración final de proteínas al 50% de la concentración anterior;
- v. Se reemplaza todo el medio cada 48 horas por medio fresco que contiene 50% de la concentración de proteína anterior;
- vi. Se dejan crecer las células en el medio que contiene el 50% de la concentración de proteína anterior hasta que el cultivo alcance la confluencia;
- vii. Se repite el procedimiento (iv) a (vi), reduciendo en cada ciclo la concentración de la proteína contenida en el medio hasta el 50% de la usada en el ciclo anterior, hasta alcanzar una concentración de proteína que provoque la muerte de celular.
- viii. A partir de un cultivo con más de 80% de viabilidad crecido en la concentración pre-crítica, las células se siembran en al menos 3 réplicas a una densidad de  $2 - 6 \times 10^5$  células/ml en medio de cultivo a la concentración pre-crítica, y después de 48 horas se reemplaza el 25% del sobrenadante del cultivo por medio fresco sin proteína quedando la concentración final de proteína al 75% de la concentración pre-crítica;
- ix. Se reemplaza todo el medio cada 48 horas por medio fresco que contiene 75% de la concentración pre-crítica;
- x. Se dejan crecer las células en el medio que contiene el 75% de la concentración pre-crítica de proteína hasta que el cultivo alcance la confluencia;
- xi. Se siembra la línea celular derivada del paso anterior en al menos 3 réplicas a una densidad de  $2 - 6 \times 10^5$  células/ml en el medio que contiene 75% de la concentración pre-crítica de proteína y después de 48 horas de crecimiento, se reemplaza el 25% del sobrenadante del cultivo por medio

- fresco libre de proteína, quedando la concentración final de proteína al 75% de la concentración anterior;
- xii. Se reemplaza todo el medio cada 48 horas por medio fresco que contiene 75% de la concentración anterior;
- 5      xiii. Se dejan crecer las células en el medio que contiene el 75% de la concentración anterior de proteína hasta que el cultivo alcance la confluencia;
- xiv. Se repite el procedimiento (xi) a (xiii) reduciendo en cada ciclo la concentración de la proteína contenida en el medio hasta el 75% de la  
10      usada en el ciclo anterior, hasta alcanzar una concentración de proteína tal que cuando las células se transfieren a una concentración más baja crecen con una viabilidad similar y con el tiempo de doblaje original, de manera que la disminución subsiguiente de la concentración de proteína no afecta la viabilidad ni el tiempo de doblaje.
- 15      En el método de adaptación propuesto en la presente invención, el medio de cultivo en el cual inicialmente se siembran las células comprende entre el 5% y el 10% de suero fetal bovino.
- En dicho método, la línea celular de mamífero que se adapta a crecer en medio libre de proteína es un mieloma, particularmente NSO.
- 20      La invención también puede ser aplicada para la adaptación de NSO transfectada con una secuencia que codifica una proteína o polipéptido recombinante, particularmente cuando la secuencia codifica un anticuerpo recombinante o sus fragmentos, por lo que la misma también incluye las líneas celulares de mamífero adaptadas a crecer en medio libre de proteína.
- 25      En diferentes materializaciones de la invención la misma proporciona líneas celulares de mamífero que expresan cualesquiera de los anticuerpos humanizados o quiméricos anti-receptor de EGF hR3, anti-CD6 T1hT, anti-CD3 T3Q o sus fragmentos, adaptadas a crecer mediante el método de la invención en medio libre de proteína, así como los referidos anticuerpos obtenidos a partir de dichas líneas.
- 30      Las líneas adaptadas por el método de la invención crecen establemente en condiciones de medio libre de suero y proteínas por al menos 40 generaciones.

**Ejemplos de Realización:**



**Ejemplo 1:** Adaptación de la línea celular recombinante hR3 a medio libre de proteínas.

La línea celular recombinante hR3 fue obtenida por la transfección de la línea celular de mieloma NSO con las construcciones de los vectores para la expresión de las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo monoclonal humanizado hR3 que reconoce el receptor del EGF humano.

La adaptación de esta línea celular a medio libre de proteínas se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito previamente, por medio de una reducción del contenido de proteínas en dos etapas.

Las células fueron inicialmente cultivadas en medio RPMI-1640 suplementado con un 10 % de suero fetal bovino (SFB) y luego a partir de una concentración de proteínas de 0.15 mg/mL el suero fetal fue reemplazado por el suplemento rico en proteínas, Nutridoma NS (Boheringer Mannheim) añadido al medio basal RPMI-1640 (medio libre de suero). La reducción en el contenido de proteínas se realizó por diluciones sucesivas en medio PFHM-II (Gibco) del contenido de proteínas presentes en el medio inicial.

Los resultados del cálculo de las concentraciones críticas y las velocidades de adaptación  $V_{adapt}$  para esta línea celular se muestran en las Fig. 1 y 2 respectivamente.

**Ejemplo 2:** Adaptación de la línea celular recombinante T1hT a medio libre de proteínas.

La línea celular recombinante T1hT fue obtenida por la transfección de la línea celular de mieloma NSO con las construcciones de los vectores para la expresión de las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo monoclonal T1hT humanizado por el método de supresión de epítopes T y que reconoce el receptor CD6 de linfocitos T humanos.

La adaptación de esta línea celular a medio libre de proteínas se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito en el punto 2, por medio de una reducción del contenido de proteínas en dos etapas.

Las células fueron inicialmente cultivadas en medio RPMI-1640 suplementado con un 10 % SFB. La reducción en el contenido de proteínas se realizó por diluciones sucesivas en medio PFHM-II (Gibco) del contenido de proteínas presentes en el medio inicial.

Los resultados del cálculo de las concentraciones críticas y las velocidades de adaptación  $V_{\text{adapt}}$  para esta línea celular se muestran en las Fig. 3 y 4 respectivamente.

5 Ejemplo 3: Adaptación de la línea celular recombinante T3Q a medio libre de proteínas.

La línea celular recombinante T3Q fue obtenida por la transfección de la línea celular de mieloma NSO con las construcciones de los vectores para la expresión de las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo monoclonal T3Q humanizado por el método de supresión de epítopes T y que reconoce el receptor CD3 de linfocitos T humanos.

10 La adaptación de esta línea celular a medio libre de proteínas se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito en el punto 2, por medio de una reducción del contenido de proteínas en dos etapas.

Las células fueron inicialmente cultivadas en medio RPMI-1640 suplementado con un 10 % SFB. La reducción en el contenido de proteínas se realizó por diluciones  
15 sucesivas en medio PFHM-II (Gibco) del contenido de proteínas presentes en el medio inicial.

Los resultados del cálculo de las concentraciones críticas y las velocidades de adaptación  $V_{\text{adapt}}$  para esta línea celular se muestran en las Fig. 5 y 6 respectivamente.

20 Breve descripción de las figuras:

*Figura 1:* Correlación de los tiempos necesarios para adaptar la línea hR3 a cada concentración de proteínas (hasta que se recupere la viabilidad y el tiempo de  
25 doblaje) con el logaritmo natural del inverso de la concentración de proteínas. Los valores de concentraciones críticas de proteínas para la línea celular hR3 son: - 0.32 y 0.11 mg/mL de la concentración de proteínas totales.

*Figura 2:* Correlación del tiempo total transcurrido desde el inicio del procedimiento de adaptación con al logaritmo natural del inverso de la concentración de proteínas  
30 para la línea celular h-R3. Valor de la velocidad de adaptación de esta línea en la fase crítica: - 0.0053 mg/d.

*Figura 3:* Correlación de los tiempos necesarios para adaptar la línea T1hT a cada concentración de proteínas (hasta que se recupere la viabilidad y el tiempo de doblaje) con el logaritmo natural del inverso de la concentración de proteínas. Los

valores de concentraciones críticas de proteínas para la línea celular T1hT son: - 0.12 y 0.01 mg/mL de la concentración de proteínas totales.

**Figura 4:** Correlación del tiempo total transcurrido desde el inicio del procedimiento de adaptación con al logaritmo natural del inverso de la concentración de proteínas para la línea celular T1hT. Valor de la velocidad de adaptación de esta línea en la fase crítica: - 0.0014 mg/d.

**Figura 5:** Correlación de los tiempos necesarios para adaptar la línea T3Q a cada concentración de proteínas (hasta que se recupere la viabilidad y el tiempo de doblaje) con el logaritmo natural del inverso de la concentración de proteínas. El valor de concentración crítica de proteínas para la línea celular T3Q es de: - 0.63 mg/mL de la concentración de proteínas totales.

**Figura 6:** Correlación del tiempo total transcurrido desde el inicio del procedimiento de adaptación con al logaritmo natural del inverso de la concentración de proteínas para la línea celular T3Q. Valor de la velocidad de adaptación de esta línea en la fase crítica: - 0.0172 mg/d.

## REIVINDICACIONES

- 1.- Un método para obtener una línea celular de mamífero adaptada a crecer en medio libre de suero y proteína que comprende dos etapas:
- 5 I. Una primera etapa en la cual a partir de una línea con una viabilidad celular entre 80 y 100%, las células se crecen sucesivamente en medio de cultivo con concentraciones decrecientes de proteína hasta alcanzarse una concentración crítica de proteína donde la viabilidad cae a 0%;
- 10 II. Una segunda etapa donde una vez determinada la concentración crítica, se busca la concentración anterior donde aún existe crecimiento celular considerada como concentración pre-crítica, y a partir de la misma se disminuye lentamente dicha concentración de proteína hasta que las células recuperen la viabilidad y el tiempo de doblaje original.
- 15 2.- Método según la reivindicación 1 caracterizado porque para ejecutar la primera etapa se efectúan los siguientes pasos:
- i Las células se siembran en al menos 3 réplicas a una densidad de  $1.5 \times 10^5$  células/ml en medio de cultivo conteniendo suero y proteínas, después de 48 horas la mitad del sobrenadante del cultivo se reemplaza por medio fresco libre de proteína quedando la
- 20 concentración final de proteína al 50% de la concentración inicial;
- ii Se reemplaza todo el medio de cultivo cada 48 horas por el medio fresco con 50% de la concentración inicial de proteínas;
- iii Se dejan crecer las células en el medio con 50% de la concentración inicial de proteínas hasta que el cultivo alcance la confluencia;
- 25 iv Se siembran las células obtenidas en el paso anterior (iii) en al menos 3 réplicas a una densidad de  $1.5 \times 10^5$  células/ml en el medio que contiene 50% de la concentración inicial de proteína y después de 48 horas de crecimiento, se reemplaza la mitad del sobrenadante del cultivo por medio fresco libre de proteína, quedando la concentración final de proteínas al 50% de la concentración anterior;
- 30 v Se reemplaza todo el medio cada 48 horas por medio fresco que contiene 50% de la concentración de proteína anterior;
- vi Se dejan crecer las células en el medio que contiene el 50% de la concentración de proteína anterior hasta que el cultivo alcance la confluencia;

- vii Se repite el procedimiento (iv) a (vi), reduciendo en cada ciclo la concentración de la proteína contenida en el medio hasta el 50% de la usada en el ciclo anterior, hasta alcanzar una concentración de proteína que provoque la muerte de celular.
- 5 3.- Método según la reivindicación 1 caracterizado porque para ejecutar la segunda etapa se efectúan los siguientes pasos:
- viii A partir de un cultivo con más de 80% de viabilidad crecido en la concentración pre-crítica, las células se siembran en al menos 3 réplicas a una densidad de  $2 - 6 \times 10^5$  células/ml en medio de cultivo a la concentración pre-crítica, y después de 48 horas se reemplaza el 25% del sobrenadante del cultivo por medio fresco sin proteína quedando la concentración final de proteína al 75% de la concentración pre-crítica;
- 10 ix Se reemplaza todo el medio cada 48 horas por medio fresco que contiene 75% de la concentración pre-crítica;
- x Se dejan crecer las células en el medio que contiene el 75% de la concentración pre-crítica de proteína hasta que el cultivo alcance la confluencia;
- 15 xi Se siembra la línea celular derivada del paso anterior en al menos 3 réplicas a una densidad de  $2 - 6 \times 10^5$  células/ml en el medio que contiene 75% de la concentración pre-crítica de proteína y después de 48 horas de crecimiento, se reemplaza el 25% del sobrenadante del cultivo por medio fresco libre de proteína, quedando la concentración final de proteína al 75% de la concentración anterior;
- 20 xii Se reemplaza todo el medio cada 48 horas por medio fresco que contiene 75% de la concentración anterior;
- xiii Se dejan crecer las células en el medio que contiene el 75% de la concentración anterior de proteína hasta que el cultivo alcance la confluencia;
- 25 xiv Se repite el procedimiento (xi) a (xiii) reduciendo en cada ciclo la concentración de la proteína contenida en el medio hasta el 75% de la usada en el ciclo anterior, hasta alcanzar una concentración de proteína tal que cuando las células se transfieren a una concentración más baja crecen con una viabilidad similar y con el tiempo de doblaje original, de manera que la disminución subsiguiente de la concentración de proteína
- 30 no afecta la viabilidad ni el tiempo de doblaje.

4.- El método según las reivindicaciones 1 a la 3 caracterizado porque el medio en el cual inicialmente se siembran las células comprende entre el 5% y el 10% de suero fetal bovino.

- 5.- El método según las reivindicaciones de la 1 y 4 caracterizado porque la línea celular de mamífero adaptada a crecer en medio libre de proteína es un mieloma.
- 5      6.- El método según la reivindicación 5 caracterizado porque el mieloma es NSO.
- 7.- El método según la reivindicación 6 caracterizado porque dicha línea celular es NSO transfectada con una secuencia que codifica una proteína o polipéptido recombinante.
- 10      8.- El método según la reivindicación 7 caracterizado porque dicha secuencia codifica un anticuerpo recombinante o sus fragmentos.
- 9.- Una línea celular de mamífero obtenida según el método de las reivindicaciones de la 1 a la 8, caracterizada porque está adaptada a crecer en medio libre de proteína.
- 15      10.- Una línea celular de mamífero según reivindicación 9 caracterizada porque es un mieloma.
- 11.- Una línea celular de mamífero según reivindicación 10 caracterizada porque el
- 20      mieloma es NSO.
- 12.- Una línea celular de mamífero según reivindicación 11 caracterizada porque la línea NSO contiene una secuencia que codifica una proteína o polipéptido recombinante.
- 25      13.- Una línea celular de mamífero según reivindicación 12 caracterizada porque la secuencia codifica un anticuerpo recombinante o sus fragmentos.
- 14.- Una línea celular de mamífero según reivindicación 13 caracterizada porque la
- 30      secuencia codifica el anticuerpo humanizado contra el receptor de EGF hR3 o sus fragmentos.

15.- Una línea celular de mamífero según reivindicación 13 caracterizada porque la secuencia codifica el anticuerpo humanizado contra el antígeno CD6 T1hT o sus fragmentos.

5 16.- Una línea celular de mamífero según reivindicación 13 caracterizada porque la secuencia codifica el anticuerpo quimérico contra el antígeno CD3 T3Q o sus fragmentos.

17.- Uso del método de las reivindicaciones de la 1 a la 8 para la obtención de líneas celulares adaptadas a crecer en medio libre de proteínas.

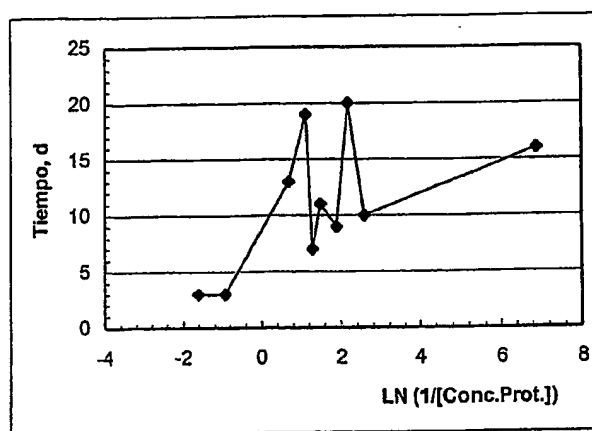
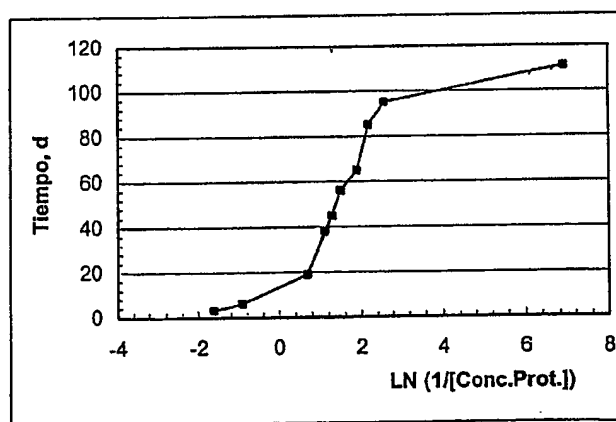
10

18.- Un anticuerpo humanizado contra el receptor de EGF hR3 o sus fragmentos, producidos por la línea celular obtenida por el método de las reivindicaciones de la 1 a la 8.

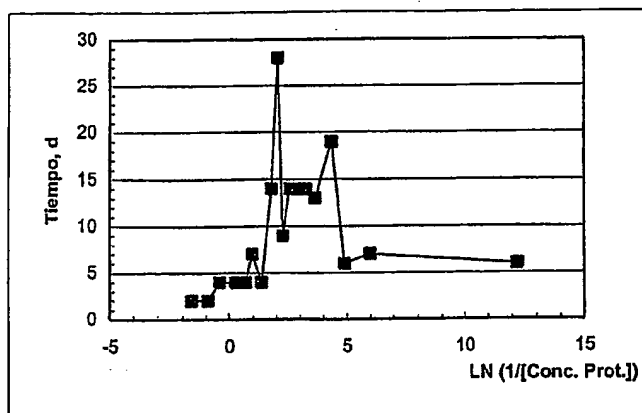
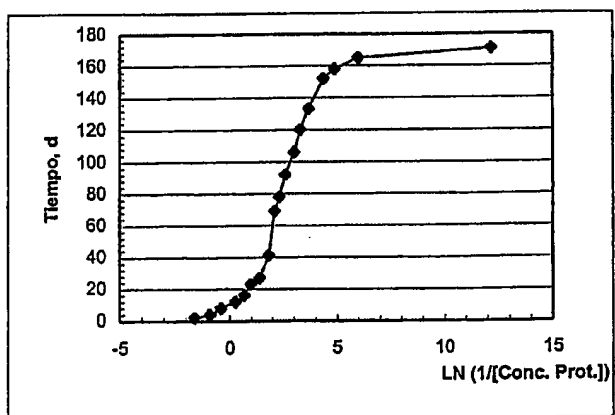
15 19.- Un anticuerpo humanizado contra el antígeno CD6 T1hT o sus fragmentos, producidos por la línea celular obtenida por el método de las reivindicaciones de la 1 a la 8.

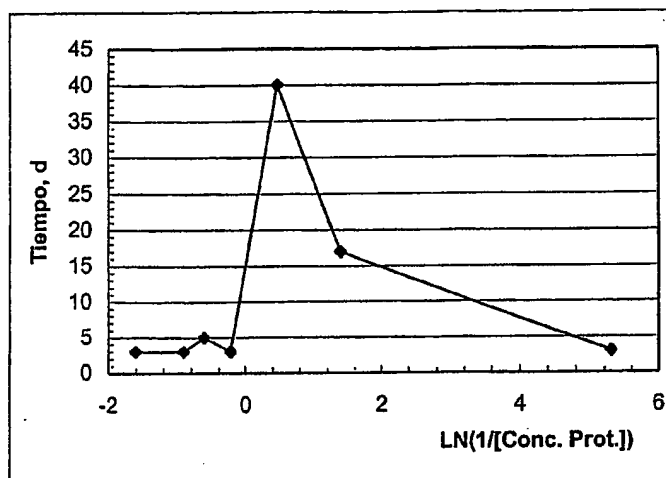
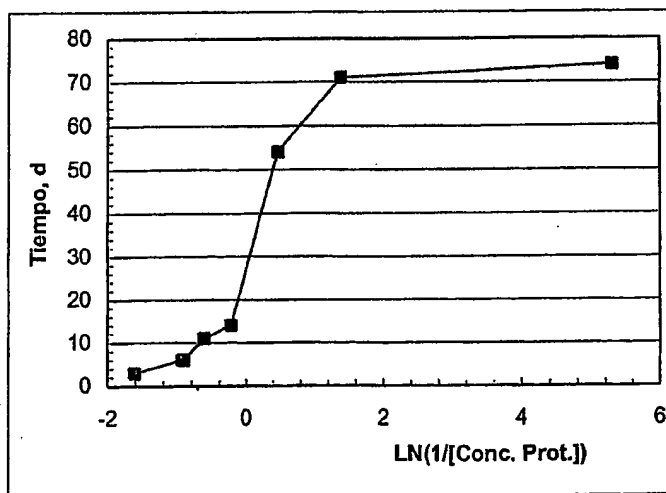
20.- Un anticuerpo quimérico contra el antígeno CD3 T3Q o sus fragmentos, producidos por la línea celular obtenida por el método de las reivindicaciones de la 1 a la 8.

20

*Figura 1**Figura 2*



*Figura 3**Figura 4*

*Figura 5**Figura 6*

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Publication No.  
PCT/CU 03/00012-0

## CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC<sup>7</sup>: C12N 5/00, C12P 21/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC<sup>7</sup>: C12N 5/00, C12P 21/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, CAS, Medline

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 6100061 A (REITER et al.) 8 August 2000 (08.08.00) <i>claims 1,10.</i>	1-13,17
Y	AU 2986484 A (MONO PUMPS LTD) 3 January 1985 (03.01.85) <i>claims 1-6.</i>	1-13,17
Y	Hybridoma-SFM: Serum-Free and Protein-Free Media for Hybridoma Culture. Data sheet from GIBCO INVITRON CORPORATION, August 2002 [retrieved on 8 January 2003 (08.01.03)]. Retrieved from the Internet: <URL: <a href="http://invitrogen.com/content/sfs/manuals/3913.pdf">http://invitrogen.com/content/sfs/manuals/3913.pdf</a> the whole data sheet.	1-13,17

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

„A“ document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

„E“ earlier application or patent but published on or after the international filing date

„L“ document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

„O“ document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

„P“ document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

„T“ later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

„X“ document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

„Y“ document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

„&“ document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 January 2003 (08.01.2003)

Date of mailing of the international search report

11 February 2004 (11.02.2004)

Name and mailing address of the ISA/AT

Austrian Patent Office

Dresdner Straße 87, A-1200 Vienna

Facsimile No. 1/53424/535

Authorized officer

MOSSER R.

Telephone No. 1/53424/437

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/JP 03/00012-0

Patent document cited in search report			Publication date	Patent family member(s)			Publication date
A				none			
AU	A	2986484	1985-01-03	none			
US	A	6100061	2000-08-08	US	A	2002182679	2002-12-05
				US	B	6475725	2002-11-05
				AT	B	407255B	2001-02-26
				AT	A	107397	2000-06-15